

氏名	前田 晋太郎
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第 7 8 号
学位記授与年月日	平成 2 6 年 3 月 2 0 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）
論文題目	「ウシ心筋 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製と 2 次元結晶化」
論文審査委員	（主査）教授 城 宜嗣 （副査）教授 宮澤 淳夫 （副査）教授 水島 恒裕 （副査）教授 安永 卓生 （九州工業大学情報工学部生命情報工学科） （副査）特任教授 吉川 信也 （兵庫県立大学大学院生命理科学研究科）

## 1. 論文内容の要旨

$F_0F_1$ -ATP 合成酵素は呼吸鎖にある巨大な（分子量 6 0 万）膜タンパク質複合体であり、ATP の合成・加水分解を触媒する  $F_1$  とプロトン能動輸送を司る  $F_0$  との 2 サブコンプレックスから構成されている。これまでに  $F_1$  の構造は X 線構造解析により決定され、それに基づく ATP 合成反応機構の組織的な研究が進行している。しかし、 $F_0$  については、含まれる rotor ring 部位以外の立体構造は決定されておらず、エネルギー変換の機能中心であるプロトン能動輸送部位の構造は全く未知である。したがって本酵素の全体構造の結晶解析は反応機構解明に最も重要な課題である。しかし、多数のグループの長年にわたる 3 次元結晶化への組織的な取り組みにもかかわらず、成功例の報告は現在のところ皆無である。この主な原因は  $F_0$  部分の rotor ring が回転することによる構造の不均一性と不安定性に起因すると考えられる。そのため、本酵素の 3 次元結晶化は不可能であるとも推測されていた。そこで、本研究ではこれまでほとんど試みられたことがなかった本酵素の 2 次元結晶化に挑戦した。2 次元結晶化は生体膜中での環境に近い脂質 2 重膜中での結晶化であることと、3 次元結晶の結晶格子への充填によるタンパク質分子間の接触による立体構造への影響を防ぐことができるため、本酵素の生理的条件下での立体構造決定も期待される。

まず、精製条件の検討を行った。膜タンパク質の可溶化には出発物質のタンパク量と界面活性剤との量比の最適化が必要である。このため、出発物質であるミトコンドリア内膜画分を遠心分画後の沈殿の重量から定量する方法を開発し、タンパク量の最終標品の品質、収量への影響を詳細に検討した。その結果、可溶化に用いるミトコンドリア内膜懸濁液濃度は 460g/l が最適であることを明らかにした。この検討を通じて、定量精度の限界に近い濃度差が最終標品の品質に大きく影響することが認められた。実際、濃度を 430g/l に調整すると酵素活性および酵素の完全性の指標であるオリゴマイシン感受性共に大きく低下した。また含有リン脂質量は影響されなかったが、リン脂質組成は大きく変化し、最適濃度ではミトコンドリア内膜のリン脂質組成にほぼ一致した。この定量法の導入により、精製標品の品質が大幅に向上し、以下の結晶化条件探索の効率化に大きく寄与した。

次に、2次元結晶化の場を形成するリン脂質の構造の2次元結晶化への効果を組織的に検討した。その結果、2本鎖の合成リン脂質である DMPC(dimylystoil ( $C_{14}$ ) phosphatidylcholine) がこれまでに検討した最適のリン脂質であった。しかし、結晶中の分子配列の規則性、出現頻度が不十分であったため、さらに一本鎖脂質である lysoPC (monoacylphosphatidylcholine) の添加効果をその脂肪酸鎖の構造と添加量について検討した。その結果、 $C_{12}$  直鎖アシル基を持つ lysoPC を DMPC の 1/10 量添加により、特に結晶の出現頻度と面積（極低温電子線回折実験に不可欠）に大幅な向上が認められた。しかし、この条件でも2次元結晶からの  $F_o$  の脱落が認められ極低温電子線回折実験にはなお不十分であった。結晶化には脂質2重膜の流動性を保持するため  $27^{\circ}\text{C}$  1週間静置する必要があるがこの脱落はその間の酵素の変性によるものと考えられる。そこで、リン脂質の組成を DMPC:DLPC = 1:1 に変更して  $20^{\circ}\text{C}$  で結晶化したところ  $F_o$  の脱落をほぼ完全に防ぐことに成功した。(DMPC、DLPC の炭素鎖はそれぞれ  $C_{14}$ ,  $C_{12}$  で後者の融点は前者より約  $20^{\circ}\text{C}$  低い。) さらに、本精製標品には報告されているサブユニットが全て含まれていることおよび結晶を再可溶化した標品の活性と阻害率が結晶化前のそれらとほぼ一致したことから、結晶中の酵素の立体構造に損傷がないことが明らかにされた。以上の結果から、本研究により  $F_oF_1$ -ATP 合成酵素は結晶化可能であることが実証された。

## 2. 論文審査結果

高分解能結晶構造情報なしに、タンパク質の反応機構の原子レベルでの解析は不可能である。また2次元結晶解析はほぼ生理条件下での結晶化であるので、その構造情報も反応機構解明に不可欠である。事実、このような構造情報が得られていないため  $F_oF_1$ -ATP 合成酵素の、特にプロトン輸送反応の原子レベルの反応機構解析はほとんど進んでいない。全体構造が決

定されていないため、従来は、サブユニット断片のX線構造を単粒子解析像（18Å分解能）にあてはめることが主流となっていた。しかし、このような研究方向では本質的な機構解明は永久に望めない。上述の通り本酵素は結晶化不可能であるとの推測もあるため、この酵素の結晶化への挑戦の気運は年々低下している。したがって、本論文記載の研究成果（本酵素結晶化の実証）は本質的な機構解明の第一歩として重要であるだけでなく、上述の結晶化挑戦気運を上昇に転じさせることが期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成26年1月31日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。